

New lipopolyamines, their preparation and their use

Patent number: FR2646161
Publication date: 1990-10-26
Inventor: BEHR JEAN-PAUL; LOEFFLER JEAN-PHILIPPE
Applicant: CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)
Classification:
- international: C07F9/10; C07K5/06; C12N15/87
- european: C07F9/10; C12N15/88; A61K47/48H4B
Application number: FR19890009933 19890724
Priority number(s): FR19890009933 19890724; FR19890005037 19890417

Abstract of **FR2646161**

New lipopolyamines of general formula I, their salts, their preparation and their use.
 $n = 1$ to 5 and $m = 2$ to 6

R represents a radical ($X = CH_2, CO$; R_3 and R_4 aliphatic radical containing 11 to 21 carbon atoms),
their preparation and their use.

The lipopolyamines of general formula I are particularly useful as vectors for the transfection of eucaryotic cells.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 646 161

②1 N° d'enregistrement national : 89 09933

⑤1 Int Cl^s : C 07 K 5/06; C 07 F 9/10; C 12 N 15/87.

①2 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 24 juillet 1989.

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE SCIENTIFIQUE, Etablissement public national à
caractère scientifique et technologique. — FR.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 43 du 26 octobre 1990.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

Division demandée le 24 juillet 1989 bénéficiant de la date de
dépôt du 17 avril 1989 de la demande initiale n° 89 05037 (art.
14 de la loi du 2 janvier 1968 modifiée).

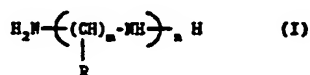
⑦2 Inventeur(s) : Jean-Paul Behr ; Jean-Philippe Loeffler.

⑦3 Titulaire(s) :

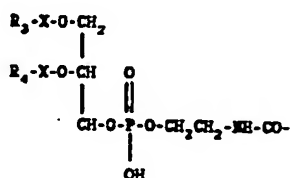
⑦4 Mandataire(s) : Rhône-Poulenc Santé, Service brevets
Santé.

⑤4 Nouvelles lipopolyamines, leur préparation et leur emploi.

⑤7 Nouvelles lipopolyamines de formule générale I, leurs sels,
leur préparation et leur emploi.



n = 1 à 5 et m = 2 à 6
R représente un radical



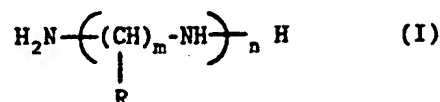
(X = CH₂, CO; R₃ et R₄ radical aliphatique contenant 11 à 21
atomes de carbone), leur préparation et leur emploi.

Les lipopolyamines de formule générale I sont particulière-
ment utiles comme vecteurs de transfection de cellules
eucaryotes.

FR 2 646 161 - A1

D

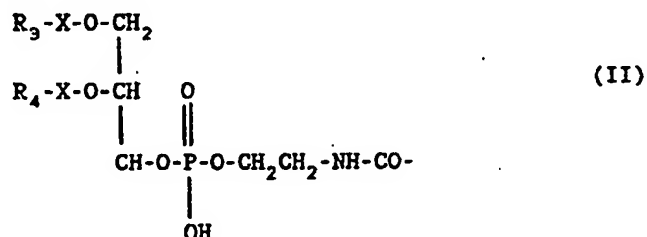
La présente invention concerne de nouvelles lipopolyamines de formule générale :



sous forme D, L ou DL, leurs sels, leur préparation et leur emploi.

5 Dans la formule générale (I),

- n est un nombre entier compris entre 1 et 5 inclusivement,
- m est un nombre entier compris entre 2 et 6 inclusivement,
- R représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale:



10 dans lequel X représente un groupement méthylène (-CH₂-) ou un groupement carbonyle (-CO-), et R₃ et R₄, identiques ou différents, représentent chacun un radical aliphatique saturé C_p·H_{2p}·+2 ou insaturé C_p·H_{2p}· ou C_p·H_{2p}·-2, p étant un nombre entier compris entre 11 et 21 inclusivement, étant entendu que :

- 15 - quelles que soient les valeurs de m et n, un seul des symboles R représente un radical de formule générale (II)
- lorsque n est compris entre 2 et 5, les valeurs de m dans les

différents fragments $\underset{\text{R}}{\text{CH}}_m$ peuvent être identiques ou différentes.

20 D'un intérêt tout particulier sont les produits de formule générale (I) dans laquelle n est égal à 3 et les valeurs de m dans les

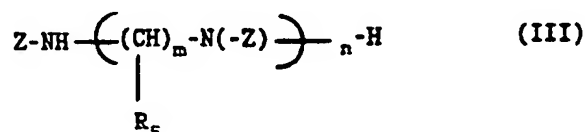
fragments $\underset{\text{R}}{\text{CH}}_m$ sont identiques ou différentes et représentent 3

ou 4, et R représente un radical de formule générale (II) dans lequel R₃-X- et R₄-X- représentent chacun un radical alcanoylé contenant 12 à

22 atomes de carbone.

Plus particulièrement intéressant encore est la 5-carboxyspermylamide de la dipalmitoylphosphatidyléthanolamine (DPPES).

5 Selon l'invention, les nouvelles lipopolyamines de formule générale (I) peuvent être obtenues par action sur un produit de formule générale :

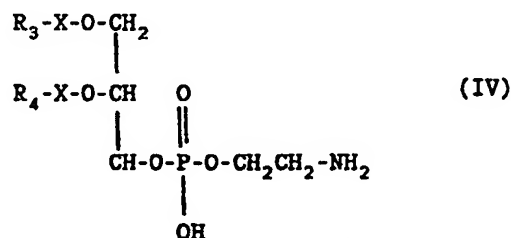


10 dans laquelle m et n sont définis comme précédemment, R₅ représente un atome d'hydrogène ou un radical carboxy et les symboles Z représentent un groupement protecteur de la fonction amine, étant entendu que :

- quelles que soient les valeurs de m et n, un seul des symboles R₅ représente un radical carboxy
- lorsque n est compris entre 2 et 5, les valeurs de m des différents

15 fragments $\underset{\text{R}}{\underset{|}{\text{(CH)}}_m}$ peuvent être identiques ou différentes, d'un

produit de formule générale :



dans laquelle R₃, R₄ et X sont définis comme précédemment, suivie du remplacement des groupements protecteurs Z par un atome d'hydrogène.

20 Lorsque l'on fait réagir un produit de formule générale (IV) sur un produit de formule générale (III), il est particulièrement avantageux de traiter préalablement la fonction acide du produit de formule générale (III) par le N-hydroxysuccinimide en opérant dans un solvant organique choisi parmi les hydrocarbures aliphatiques
25 halogénés (chlorure de méthylène) et les éthers (tétrahydrofuranne) en

présence d'un imide tel que le dicyclohexylcarbodiimide, avant d'effectuer la condensation du produit de formule générale (IV). La condensation de l'ester mixte sur le produit de formule générale (IV) s'effectue généralement dans un solvant organique (chloroforme, 5 éthanol) en présence d'une base organique telle que la triéthylamine à une température comprise entre 30 et 50°C.

Généralement, on utilise un groupement protecteur Z qui est facilement remplaçable par un atome d'hydrogène sans toucher au reste de la molécule. Il est particulièrement avantageux d'utiliser 10 comme groupement protecteur le radical t.butoxycarbonyl qui est facilement remplaçable par un atome d'hydrogène au moyen d'un acide (acide trifluoroacétique).

Les produits de formule générale (III) dans laquelle n est supérieur à 1 peuvent être obtenus à partir de l'ornithine par 15 cyanoalkylation suivie de réduction des fonctions nitriles en fonctions amines, puis protection des fonctions amines ainsi obtenues.

Les produits de formule générale (IV) sont des produits connus qui sont facilement accessibles.

Les nouveaux produits de formule générale (I) présentent 20 la propriété, dispersés dans l'eau, de former des nanoparticules unilamellaires, qui sont instables en milieu ionique, et qui s'associent fortement, par leur partie cationique, avec l'ADN plasmidique ou oligonucléotidique en le compactant et en le recouvrant d'une couche lipidique. En utilisant un excès de charges cationiques 25 par rapport à l'acide nucléique, les complexes lipide/ADN peuvent être adsorbés sur les membranes cellulaires facilitant ainsi la capture de l'ADN par les cellules.

Les produits de formule générale (I) constituent des vecteurs spécifiques, non toxiques, biodégradables et de grande 30 efficacité pour réaliser la transfection de cellules eucaryotes (lignées cellulaires, cultures primaires).

Selon l'invention, la transfection est réalisée en mettant en contact une suspension de cellules en absence de sérum avec un mélange transfectant obtenu, au moment de sa mise en oeuvre, à partir 35 d'une solution de la lipopolyamine de formule générale (I) et d'une

solution de l'ADN dans un milieu convenable.

Il est particulièrement avantageux d'opérer en milieu très dilué (1 à 5 nanomolaire) et d'utiliser un excès (de 2 à 5 fois) de charges de la lipopolyamine par rapport à l'ADN.

5 La durée de la transfection peut être comprise entre 10 minutes et 48 heures indépendamment de la nature des cellules.

Le procédé selon l'invention présente l'avantage de pouvoir s'appliquer à des lignées cellulaires d'origines diverses (incluant par exemple LMKT, Ras4, CHO, F9, Bu4, S49, Hela et AtT20)
10 ainsi qu'à des cellules primaires sans qu'il soit nécessaire d'optimiser ou de modifier les conditions de mise en oeuvre du procédé.

Par ailleurs, les lipopolyamines de formule générale (I) permettent de transfecter des cellules fragiles (cellules
15 hypophysaires intermédiaires ou antérieures, cellules chromaffin, neurones périphériques ou centraux) qu'il n'était pas possible de transfecter par application de méthodes classiques (copréciptation au phosphate de calcium ou les techniques au dextrane).

Enfin, les agents de transfection selon l'invention ne
20 manifestent pas de toxicité vis-à-vis des cellules transfectées. Ils ne manifestent pas de toxicité aiguë chez le rat après injection intracérébrale ou systémique.

La présente invention a pour objet également une solution alcoolique ou aqueuse stable d'une lipopolyamine de formule générale
25 (I) utilisable pour la réalisation de transfections cellulaires.

Généralement, on prépare des solutions à 1 mg/ml qui permettent la réalisation d'environ 50 transfections.

L'exemple suivant, donné à titre non limitatif, montre comment l'invention peut être mise en pratique.

30 EXEMPLE

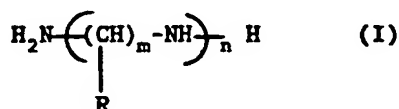
On traite pendant 12 heures la L-5-carboxy-tétra-t.butoxy-carbonylspermine (1 équivalent) par la N-hydroxysuccinimide (1,1 équivalent) en présence de dicyclohexylcarbodiimide (1,1 équivalent) en opérant dans un mélange chlorure de méthylène-tétrahydrofuranne.

L'ester obtenu est traité par la dipalmitoylphosphatidyl-
éthanolamine (1 équivalent) en présence de triéthylamine (1
équivalent) dans un mélange chloroforme-éthanol pendant 12 heures à
40°C. Après traitement du mélange réactionnel, on obtient, avec un
5 rendement de 55 %, la tétra-t.butoxycarbonyl-5-carboxyspermylamide de
la dipalmitoylphosphatidyléthanolamine dont les groupements
protecteurs sont éliminés par l'acide trifluoroacétique dans le
chlorure de méthylène. On obtient ainsi la 5-carboxyspermylamide de la
dipalmitoylphosphatidyléthanolamine (DPPES) sous forme de
10 tétratrifluoroacétate.

La structure du produit obtenu est confirmée par le
spectre de résonance magnétique nucléaire du proton à 200 MHz dans le
mélange chloroforme deutéré-méthanol deutéré (1-1 en volumes)
(déplacements chimiques δ en ppm) : 0,85 [t, $(\text{CH}_3)_2$] ; [m, 2 x
15 $(\text{CH}_2)_{12}$] ; 1,5-1,65 (m, 2 x CH_2CO_2) ; 1,8-2,1 (m, 4 x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$) ; 2,3
(tt, 2 x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2$) ; 2,9-3,1 (m, 5 x CH_2N^+) ; 3,2 (bm, CH_2NDCO) ;
3,75-4,05 (m, CHN^+ , 2 x CH_2OP) ; 4,15-4,40 (2 x dd, CO_2CH_2) ; 5,20
(OCH).

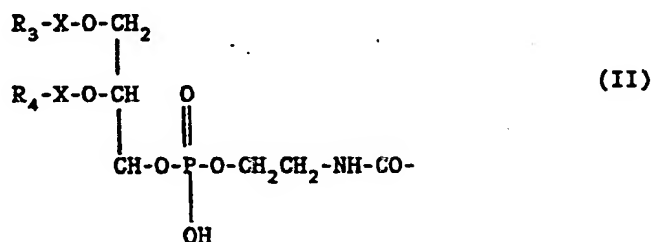
REVENDICATIONS

1 - Nouvelle lipopolyamine sous forme D, L ou DL caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale :



5 dans laquelle :

- n est un nombre entier compris entre 1 et 5 inclusivement,
- m est un nombre entier compris entre 2 et 6 inclusivement
- R représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale:



- 10 dans laquelle X représente un groupement méthylène ou un groupement carbonyle et R₃ et R₄, identiques ou différents, représentent chacun un radical aliphatique saturé C_p·H_{2p'+2} ou insaturé C_p·H_{2p'} ou C_p·H_{2p'-2}, p' étant un nombre entier compris entre 11 et 21 inclusivement, étant entendu que :
- 15 - quelles que soient les valeurs de m et n, un seul des symboles R représente un radical de formule générale (II)
- lorsque n est compris entre 2 et 5, les valeurs de m dans les

différents fragments $\underset{\text{R}}{\text{-(CH)}}_m$ peuvent être identiques ou différentes,

ainsi que ses sels.

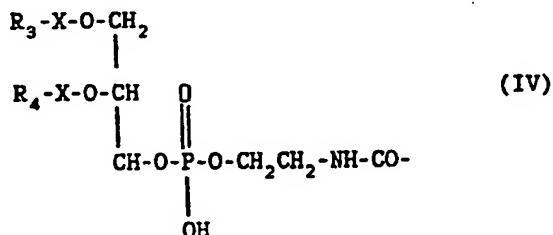
- 20 2 - Nouvelle lipopolyamine selon la revendication 1, caractérisée en ce que n est égal à 3 et les valeurs de m dans les

fragments $\begin{array}{c} \text{-(CH)}_m \\ | \\ \text{R} \end{array}$ sont identiques ou différentes et représentent 3

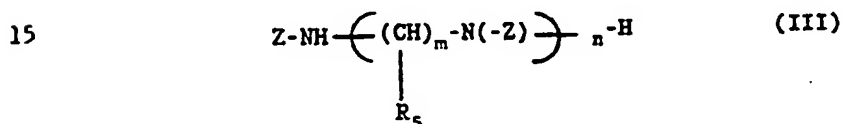
ou 4 et R représente un radical de formule générale (II) dans lequel $R_3\text{-X-}$ et $R_4\text{-X-}$ représentent chacun un radical alcanoylé contenant 12 à 22 atomes de carbone, et ses sels.

5 3 - La 5-carboxyspermylamide de la dipalmitoylphosphatidyléthanolamine.

4 - Procédé de préparation d'une lipopolyamine selon la revendication 1 pour laquelle R représente un radical de formule générale (II) caractérisé en ce que l'on fait réagir un produit de
10 formule générale :



dans laquelle R_3 , R_4 et X sont définis comme dans la revendication 1, avec un ester avec le N-hydroxysuccinimide du produit de formule générale :



dans laquelle m, n, R_5 et Z sont définis comme dans la revendication 5 en opérant dans un solvant organique choisi parmi les hydrocarbures aliphatiques chlorés et les alcools en présence d'une base organique choisie parmi les amines tertiaires, puis remplace les groupements
20 protecteurs Z par un atome d'hydrogène, et isole le produit obtenu éventuellement sous forme de sel.

5 - Utilisation d'une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 3 pour la transfection de cellules eucaryotes caractérisée en ce l'on mélange dans un milieu convenable une solution aqueuse diluée d'un produit selon l'une des revendications 1 à 3 avec
5 une solution aqueuse diluée de l'ADN plasmidique ou oligonucloétidique puis met en contact le mélange transfectant avec une suspension de cellules à transfecter.

6 - Utilisation selon la revendication 5 caractérisée en ce que l'on transfecte des lignées cellulaires ou des cultures
10 primaires.

7 - Une solution éthanolique d'un produit selon l'une des revendications 1 à 3 pour réaliser la transfection selon l'une des revendications 5 ou 6.

8 - Une solution aqueuse d'un produit selon l'une des
15 revendications 1 à 3 pour réaliser la transfection selon l'une des revendications 5 ou 6.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.